



27 AVR. 2000

FR 00/608

097936567

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

REC'D 15 MAY 2000

WIPO

PCT

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 05 AVR. 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

**DOCUMENT DE
PRIORITÉ**
PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA REGLE
17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **15 MARS 1999**
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **99 03150**
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75**
DATE DE DÉPÔT **15 MARS 1999**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET BEAU DE LOMENIE
158, rue de l'Université
75340 PARIS CEDEX 07

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention ☐ demande divisionnaire
☐ certificat d'utilité ☐ transformation d'une demande de brevet européen

☒ demande initiale
☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent **H18913/16/MLG** références du correspondant **01.44.18.89.00.** téléphone

Établissement du rapport de recherche

☐ différé ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance ☐ oui ☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

"Procédé de réduction de l'extinction de fluorescence due au milieu de mesure".

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

CIS bio international

Forme juridique

SOCIÉTÉ ANONYME

Nationalité (s) **FRANÇAISE**

Adresse (s) complète (s)

RN 306
91400 SACLAY

Pays

FR

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs ☐ oui ☒ non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES ☐ requise pour la 1ère fois ☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

GILLARD Marie-Louise
CPI N° 92-1099

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

g

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° d'enregistrement national

99 03 150

Titre de l'invention :

Procédé de réduction de l'extinction de fluorescence due au milieu de mesure

Le (s) soussigné (s)

Cabinet BEAU de LOMENIE
158 rue de l'Université
75340 PARIS CEDEX 07(FRANCE)

désigne (nt) en tant qu'inventeur (s) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

MATHIS Gérard
17 Impasse Capelle des Ladres
30200 BAGNOLS/CEZE

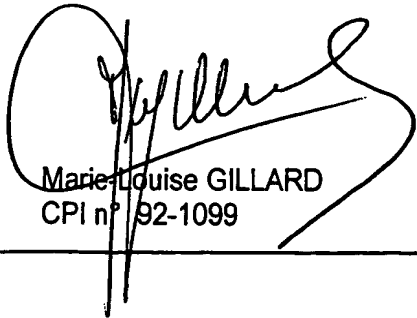
BAZIN Hervé
14 Allée de la Chenaie
30400 VILLENEUVE LES AVIGNON

TRINQUET Eric
Chemin Columbia
30130 PONT SAINT ESPRIT

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Paris, le 17 mars 1999


Marie-Louise GILLARD
CPI n° 92-1099

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDEICATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
33			X	25.06.99	08 NOV. 1999 - CN

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

L'invention concerne l'utilisation d'un conjugué fluorescent comprenant un oligonucléotide lié à un cryptate de terre rare pour réduire l'extinction de fluorescence due au milieu de mesure, dans un dosage par fluorescence d'un analyte mettant en œuvre au moins un marqueur fluorescent.

- 5 L'avancée des connaissances en biologie crée un besoin croissant pour des méthodes de diagnostic permettant de suivre ou de quantifier des biomolécules.

Dans le même temps, on observe une désaffection vis à vis des marqueurs radioactifs qui sont généralement impliqués dans les méthodes de dosage de référence. D'une façon générale, on cherche actuellement à remplacer
10 les traceurs radioactifs par d'autres marqueurs et principalement par des marqueurs fluorescents. L'utilisation de marqueurs fluorescents dans des conditions idéales permet d'obtenir des sensibilités élevées théoriquement équivalentes à celles obtenu par les traceurs radioactifs.

Dans la pratique, les performances des traceurs fluorescents sont limitées,
15 d'une part, par la présence d'un bruit de fond souvent élevé et, d'autre part, par le fait qu'ils sont généralement très sensibles aux changements dans leur environnement. Des petites modifications du pH, de la polarité, de la présence d'oxygène dissous, de la proximité d'atome lourds (iode par exemple) ou de groupes absorbants peuvent modifier leur rendement quantique (dans le sens d'une
20 exaltation ou d'une extinction) ou déplacer la longueur d'onde de l'émission.

Il est connu que l'interaction avec des protéines présentes dans le sérum provoque souvent une extinction (« quenching ») de la fluorescence.

Les problèmes inhérents aux méthodes d'analyse par mesure de la fluorescence sont répertoriés dans un article de revue (I. Hemmilä, Clin. Chem.
25 31/3, 359-370 (1985)).

Les problèmes inhérents au bruit de fond provenant de la fluorescence intrinsèque des protéines ainsi que des autres biomolécules présentes dans les échantillons biologiques peut être résolu par l'utilisation de marqueurs fluorescents formés par des complexes de terres rares (principalement l'Europium) qui permettent
30 une sélection temporelle du signal spécifique. Les durées de vie particulièrement longues (0,1ms à 1ms environ) qui caractérisent les complexes d'Europium permettent, à l'aide d'une mesure en temps résolu, de s'affranchir du bruit de fond provenant, par exemple, des protéines sériques qui lui, est caractérisé par une durée de vie relativement courte (environ 4ns).

Le marquage indirect d'acides nucléiques par un cryptate trisbipyridine-Europium [TBP-(Eu³⁺)] (cryptate décrit dans le brevet EP 0321353) a été réalisé par l'intermédiaire d'un anticorps anti-DNP marqué par ce cryptate, le groupe dinitrophényle (DNP) étant introduit à l'extrémité 5' d'oligonucléotides synthétiques
5 (E. Lopez et al., Clin. Chem. 39/2, 196-201 (1993)).

L'utilisation d'anticorps marqués à l'aide d'un cryptate TBP-(Eu³⁺) s'est par ailleurs étendu au domaine de l'immunodiagnostic. L'utilisation d'un cryptate comme marqueur a permis de développer des immuno-essais de type homogène basés sur une mesure de fluorescence en temps résolu associé à un transfert d'énergie non
10 radiatif (G.Mathis et al., Clin. Chem, 39, 1251 (1993)).

Un format de type homogène présente l'intérêt considérable de pouvoir suivre en temps réel la cinétique de formation d'un complexe immunologique, mais ne permet cependant pas de s'affranchir des interactions éventuellement défavorables entre le marqueur et les molécules présentes dans un milieu
15 biologique (extinction de la fluorescence).

Dans un milieu sérique, on peut obtenir une restauration des propriétés photophysiques, et notamment de la durée de vie, en ajoutant des ions fluorures au milieu comme décrit dans la demande WO92/01224.

On a maintenant trouvé que le fait de conjuguer une molécule de cryptate
20 de terre rare à une chaîne oligonucléotidique permet d'obtenir un conjugué fluorescent cryptate-oligonucléotide qui présente des propriétés photophysiques nouvelles et inattendues.

Ledit conjugué présente la propriété avantageuse d'être moins sensible, comparativement au cryptate seul, au phénomène d'extinction de la fluorescence
25 résultant d'une interaction avec des molécules présentes dans le milieu.

Cette observation présente un grand intérêt puisqu'elle permet de réaliser des mesures de fluorescence dans des milieux biologiques sans utilisation d'un adjuvant comme les ions fluorures.

Les conjugués cryptate-oligonucléotides constituent donc de nouveaux
30 marqueurs, qui peuvent être couplés à une molécule biologique ayant un rôle de reconnaissance et pouvant se lier à un partenaire.

Le conjugué cryptate-oligonucléotide couplé à un récepteur tel qu'un anticorps ou la streptavidine garde ses propriétés photophysiques (résistance à

l'extinction) et présente des propriétés avantageuses en comparaison des conjugués cryptate-anticorps ou cryptate-streptavidine.

L'invention concerne donc, selon un premier aspect, un procédé de réduction de l'extinction de fluorescence due au milieu de mesure, dans un dosage
 5 par fluorescence d'un analyte mettant en œuvre au moins un marqueur fluorescent, caractérisé en ce qu'on introduit dans le milieu de mesure un conjugué fluorescent comprenant un oligonucléotide lié à un cryptate de terre rare.

Par « analyte », on entend dans la présente description toute substance ou groupe de substances, ainsi que ses ou leurs analogues, que l'on souhaite détecter
 10 et/ou déterminer.

Le procédé selon l'invention trouve une application importante dans les procédés de dosage dits par compétition ou par excès, en phase homogène.

Dans la suite de la description, la notion de « cryptate » ainsi que la nomenclature des macrocycles et polycycles utilisables sont telles que définies par
 15 J.M. Lehn dans Struct. Bonding (Berlin), 16, 1, 1973 et dans Acc. Chem. Res. 11, 49, (1978).

Par « oligonucléotide », on entend dans la présente description :

- soit un enchaînement d'unités ribonucléotides ou désoxyribonucléotides liées entre elles par des liaisons de type phosphodiester ;
- 20 - soit un enchaînement d'unités ribonucléotides ou désoxyribonucléotides ou d'unités analogues de nucléotides modifiées sur le sucre ou sur la base et liées entre elles par des liaisons internucléotidiques naturelles de type phosphodiester, une partie des liaisons internucléotidiques étant éventuellement remplacée par des liaisons phosphonate, phosphoramidate ou phosphorothioate. Ces différentes familles
 25 d'oligonucléotides sont décrites dans Goodchild, *Bioconjugate Chemistry*, 1(3), May/June 1990, 77-99 ;

- soit un enchaînement comprenant à la fois des unités ribonucléotides ou désoxyribonucléotides liées entre elles par des liaisons de type phosphodiester et des unités analogues de nucléosides liées entre elles par des liaisons
 30 amides, communément dénommés « PNA » (en anglais « peptide nucleic acid »), tel que décrit dans M. Egholm et al., J. Am. Chem. Soc., 1992, 114, 1895-1897 ; de tels composés sont par exemple décrits dans R. Vinayak et al., *Nucleoside & Nucleotide*, 1997, 16 (7-9), 1653-1656.

L'utilisation de chacun de ces types d'oligonucléotides constitue un aspect
 35 avantageux de l'invention.

On entend par « analogue » de nucléotide ou de nucléoside un nucléotide/nucléoside comportant au moins une modification portant sur le sucre ou la nucléobase ou une combinaison de ces modifications. A titre d'exemple, on peut citer les modifications suivantes :

5

I. Modifications concernant le sucre (analogues de nucléotides ou de nucléosides) :

1°) La partie sucre peut être modifiée en ce que la configuration des hydroxyles (libres ou engagés dans un pont phosphate) est différente de la
10 configuration naturelle (qui est respectivement β -D-érythro en série ADN et β -D-ribo en série ARN) comme dans les analogues ayant le squelette β -D-arabino-pentofuranoside ou β -D-xylo-pentofuranoside, par exemple.

2°) La structure peut être modifiée en ce que les liaisons internucléotidiques sont de type 2' \rightarrow 5', tel que dans le cas des dérivés β -D-ribo-pentofuranoside-2'-phosphate ou 3'-désoxy- β -D-érythro-pentofuranoside-2'-phosphate.
15

Il existe des nucléotides dont la structure regroupe les deux modifications précédentes, tel que le β -D-xylo-pentofuranoside-2'-phosphate.

3°) La structure peut différer du modèle naturel en ce que la configuration du carbone 4' est opposée, c'est le cas α -L-thréo-pentofuranoside-3'-phosphate. La
20 différence peut porter sur la configuration du carbone en 1' (position anomérique) c'est le cas du α -D-érythro-pentofuranoside-3'-phosphate. Il existe des nucléotides/nucléosides dont la structure regroupe les deux modifications précédentes, tel que le β -L-thréo-pentofuranoside-3'-phosphate.

4°) La structure peut différer du modèle naturel en ce que l'oxygène en 4' est remplacé par un carbone (analogue carbocyclique) ou par un soufre tel que le
25 4'-Thio- β -D-érythro-pentofuranoside-3'-phosphate.

5°) La structure peut différer du modèle naturel en ce que l'un des hydroxyle du sucre est alkylé, par exemple dans le squelette 2'-O-Alkyl- β -D-ribo-pentofuranoside-3'-phosphate, le groupe alkyle pouvant être par exemple le groupe
30 méthyle ou allyle.

6°) La structure peut différer du modèle naturel en ce que seule la partie sucre est conservée comme dans le 1,2-didésoxy-D-érythro-pentofuranose-3-phosphate, ou en ce que le sucre est remplacé par un polyol comme le propan diol.

II. Modifications concernant la nucléobase (analogues de nucléotide) :

1°) La nucléobase peut être modifiée en ce que les substituants des bases naturelles sont modifiés comme dans la 2,6-diaminopurine, l'hypoxanthine, la 4-Thio-thymine, le 4-Thio-uracil, ou le 5-Ethynyl-uracil.

2°) Les positions des substituants peuvent être permutées par rapport aux bases naturelles tel que dans l'Isoguanosine ou l'Isocytosine.

3°) Un atome d'azote de la nucléobase peut être remplacé par un carbone comme dans la 7-Déaza-guanosine, la 7-Déaza-adénine.

10

Par ailleurs, comme mentionné ci-dessus, les liaisons entre les unités sucres ou leurs analogues peuvent également être modifiées, par exemple en remplaçant un ou plusieurs des atomes d'oxygène de la liaison phosphodiester naturelle par un carbone (série phosphonates), un azote (série phosphoramides), ou un soufre (phosphorothioates).

15

Avantageusement, l'oligonucléotide du conjugué selon l'invention est constitué d'unités ribonucléotides ou désoxyribonucléotides, dont l'une peut comporter un groupe fonctionnel introduit ou généré sur ladite unité ou un groupe fonctionnel introduit à l'aide d'un bras d'espacement lié au groupement phosphate terminal en position 3' ou 5'.

20

Selon un aspect préféré, ladite unité est l'unité 5' terminale ou 3' terminale.

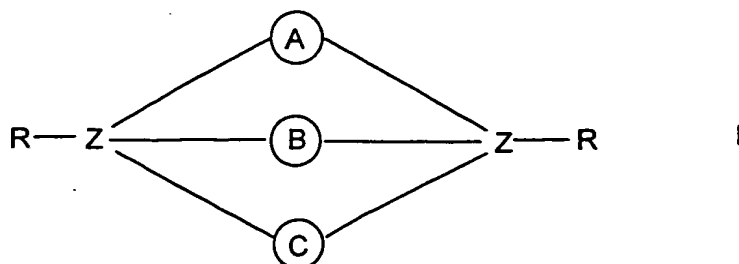
L'oligonucléotide utilisable selon l'invention comprendra de préférence un enchaînement de 5 à 50 nucléotides ou un enchaînement de 5 à 50 nucléotides et analogues de nucléotides ou de nucléosides tels que définis ci-dessus.

25

Selon un aspect particulier de l'invention, on utilisera un oligonucléotide constitué d'un enchaînement d'unités ribonucléotides ou désoxyribonucléotides liées entre elles par des liaisons de type phosphodiester, et d'unités analogues de nucléosides liées entre elles par des liaisons amide, ledit oligonucléotide comprenant au moins 5 liaisons internucléotidiques de type phosphodiester à l'extrémité destinée à être liée au cryptate.

30

Selon un aspect préféré, ledit cryptate de terre rare est constitué d'au moins un sel de terre rare complexé par un composé macropolycyclique de formule

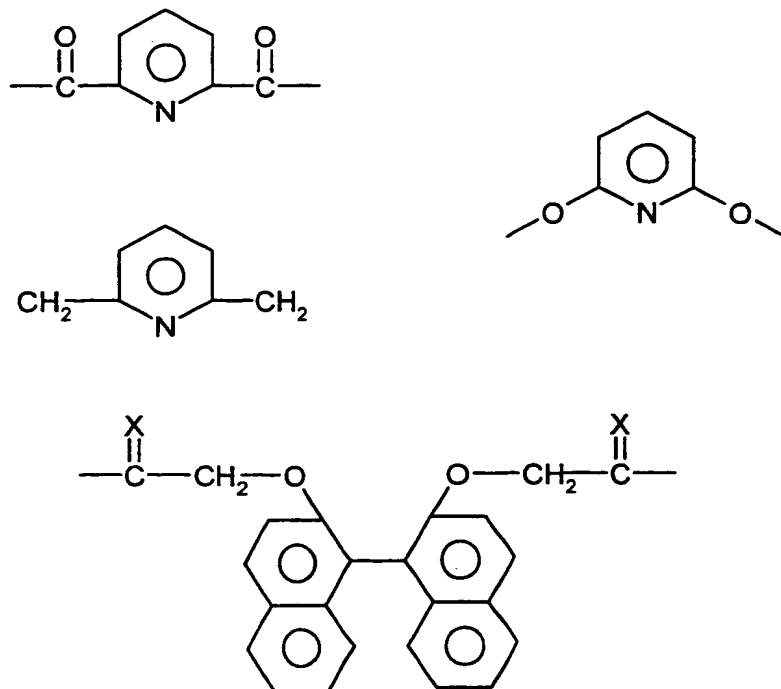


- dans laquelle Z est un atome ayant 3 ou 4 valences, R est rien ou représente l'hydrogène, le groupe hydroxy, un groupe amino ou un radical hydrocarboné, les radicaux bivalents (A), (B) et (C), sont indépendamment l'un de l'autre des chaînes hydrocarbonées qui contiennent éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes et sont éventuellement interrompues par un hétéromacrocycle, au moins l'un des radicaux (A), (B) et (C) comportant de plus au moins un motif moléculaire ou étant essentiellement constitué par un motif moléculaire, ledit motif moléculaire possédant une énergie de triplet supérieure à celle du niveau émissif de l'ion de terre rare complexé.

En particulier, ledit cryptate de terre rare répond à la formule (I) dans laquelle le motif moléculaire est choisi parmi la phénanthroline, l'anthracène, le benzène, le naphthalène, les bi- et ter-phényle, l'azobenzène, l'azopyridine, la pyridine, les bipyridines, les bisquinoléines et les composés de formules ci-après :

- C₂H₄ - X₁ - C₆H₄ - X₂ - C₂H₄ -
 - C₂H₄ - X₁ - CH₂ - C₆H₄ - CH₂ - X₂ - C₂H₄ -

X₁ et X₂ pouvant être identiques ou différents désignent l'oxygène, l'azote ou le soufre,



X étant l'oxygène ou l'hydrogène.

Avantageusement, ledit cryptate de terre rare est constitué d'un sel de terre rare complexé par l'un des composés macrocycliques ci-après :

(22)phénanthroline ; (22)phénanthroline amide ; (22)anthracène ;
 (22)anthracène amide ; (22)bi-isoquinoléine ; (22)biphényl-bis-pyridine ;
 (22)bipyridine ; (22)bi-pyridine amide ; les macropolycycles tris-bipyridine, tris-
 phénanthroline, phénanthroline-bis-bipyridine, bi-isoquinoléine-bis-bipyridine, bis-
 bipyridine diphénylbipyridine.

De tels composés sont par exemple décrits dans le brevet EP 180 492.

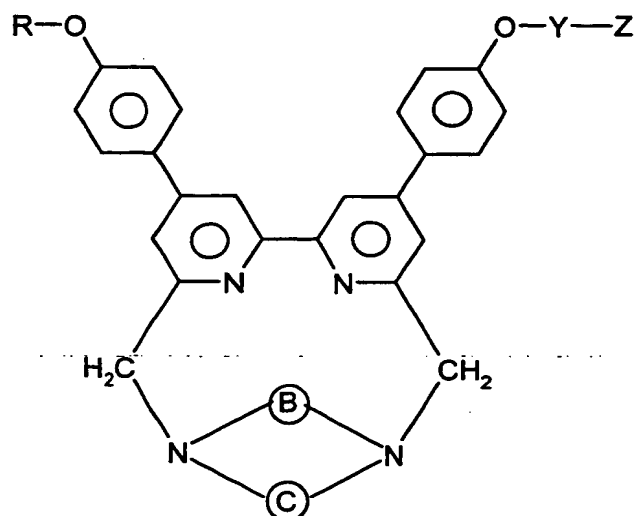
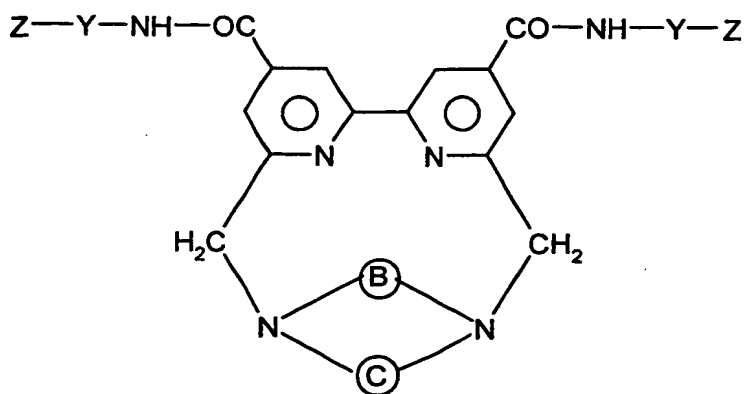
On peut également utiliser des composés macropolycycliques cryptates complexant des ions de terre rare dans lesquels le motif moléculaire est choisi parmi les bipyrazines, les bipyrimidines et les hétérocycles azotés comportant des groupes N-oxydes.

Des composés macropolycycliques à unités bipyrazines sont décrits dans F. Bodar-Houillon et al., New J. Chem., 1996, 20, 1041-1045.

Des composés macropolycycliques à unités bipyrimidines sont décrits dans J. M. Lehn et al., Helv. Chim. Acta, 1992, 75, 1221.

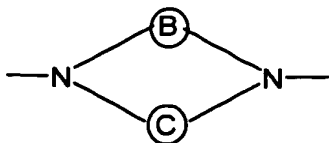
Des composés macropolycycliques comprenant des hétérocycles azotés comportant des groupes N-oxydes sont décrits dans J.M. Lehn et al., *Helv. Chim. Acta*, 1991, 74, 572.

- 5 Selon un autre aspect avantageux, ledit cryptate de terre rare est constitué d'au moins un sel de terre rare complexé par un composé macropolycyclique répondant à l'une des formules II ou III ci-après :

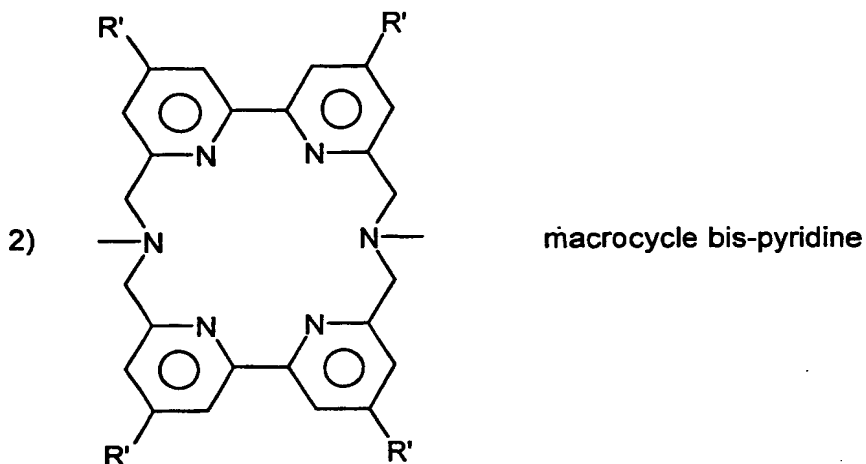
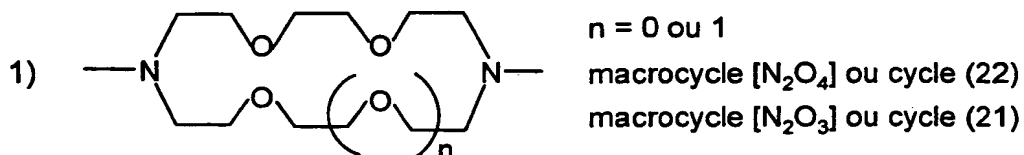


dans lesquels :

- le cycle de formule



est l'un des cycles suivants :



5

- Y est un groupe ou un bras d'espacement qui est constitué par un radical organique bivalent, choisi parmi les groupes alkylène linéaires ou ramifiés en C_1 à C_{20} contenant éventuellement une ou plusieurs doubles liaisons et/ou éventuellement contenant par un ou plusieurs hétéroatomes tels que l'oxygène, l'azote, le soufre, le phosphore ou un ou plusieurs groupe(s) carbamoyle ou carboxamido ; parmi les groupes cycloalkylène en C_5 à C_8 ou parmi les groupes arylène en C_6 à C_{14} , lesdits groupes alkylène, cycloalkylène ou arylène étant éventuellement substitués par des groupes alkyle, aryle ou sulfonate ;

15 - Z est un groupe fonctionnel susceptible de se lier de façon covalente avec une substance biologique ;

- R est un groupe méthyle ou représente le groupe -Y-Z ;

- R' est l'hydrogène ou un groupe $-COOR''$ dans lequel R'' est un groupe alkyle en C_1 à C_{10} et représente de préférence le groupe méthyle, éthyle ou tertibutyle ou bien R' est un groupe $-CO-NH-Y-Z$.

20

Selon un aspect préféré, le cryptate de terre rare du conjugué fluorescent utilisé selon l'invention est un cryptate d'euporium.

Dans un aspect avantageux, ledit cryptate de terre rare est le cryptate d'euporium Eu trisbipyridine ou Eu [bis-diéthoxybipyridine.bipyridine] .

Le cryptate de terre rare est de préférence lié de manière covalente à l'oligonucléotide soit directement, soit par l'intermédiaire d'un bras d'espacement.

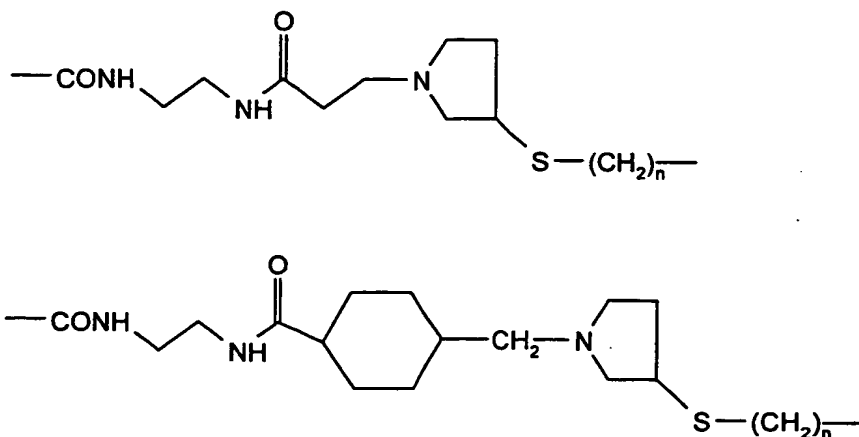
- 5 Par « liaison directe », on entend la liaison du marqueur fluorescent sur un groupe fonctionnel préalablement introduit ou généré sur un ou plusieurs atomes d'une base ou d'une unité pentofuranose de l'oligonucléotide.

- 10 Dans la présente description, on désigne par groupe fonctionnel toute fonction portée par la partie nucléotidique ou introduite sur cette partie par toute méthode connue par l'homme du métier et capable de se lier par liaison covalente, directement ou après activation avec une fonction présente sur le cryptate ou sur le bras espaceur porté par le cryptate. De tels groupes fonctionnels sont notamment les fonctions NH_2 , COOH , CHO , OH ou SH ainsi que les fonctions capables d
- 15 ou par addition (double liaisons type maléïmide). Ces fonctions sont généralement portées par une chaîne hydrocarbonée elle-même reliée à la partie nucléotidique.

- Des méthodes d'introduction de ces groupes fonctionnels sont notamment décrites dans C. Kessler, Nonisotopic probing, Blotting and Sequencing, 2nd edition, L.J. Kricka (1995), Ed. Academic press Ltd., Londres, p. 66-72. Selon un aspect
- 20 préféré de l'invention, le cryptate de terre rare est lié à l'oligonucléotide par l'intermédiaire d'un bras d'espacement . On entend par « bras d'espacement » tout moyen permettant de lier de façon covalente l'oligonucléotide avec le cryptate au niveau d'un phosphate terminal, d'un atome d'une base purique ou pyrimidique ou d'un atome du sucre.

- 25 Dans un aspect avantageux, ledit bras d'espacement est constitué par un radical organique bivalent, choisi parmi les groupes alkylène linéaires ou ramifiés en $\text{C}_1\text{-C}_{20}$, contenant éventuellement une ou plusieurs doubles liaisons ou triples liaisons et/ou contenant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes, tels que l'oxygène, l'azote, le soufre, le phosphore ou un ou plusieurs groupe(s) carbamoyle
- 30 ou carboxamido ; les groupes cycloalkylène en $\text{C}_5\text{-C}_8$ et les groupes arylène en $\text{C}_6\text{-C}_{14}$, lesdits groupes alkylène, cycloalkylène ou arylène étant éventuellement substitués par des groupes alkyle, aryle ou sulfonate.

En particulier, le bras d'espacement est choisi parmi les groupes de formules :



dans lesquelles $n = 2$ à 6 , et $\text{-CONH-(CH}_2\text{)}_6\text{-}$,

la liaison via le groupe -CONH ayant lieu au niveau du cryptate.

Selon un aspect ultérieur de l'invention, le conjugué fluorescent est lié de manière covalente à l'un des membres d'un couple de molécules capable de se lier spécifiquement entre elles, comme par exemple un couple antigène/anticorps, ligand/récepteur cellulaire, biotine/avidine, acide nucléique (notamment un ARN ou un ADN mono- ou bi-caténaire, ou un oligonucléotide mono- ou bi-caténaire) et l'acide nucléique comportant des bases complémentaires à celui-ci.

Selon un aspect du procédé selon l'invention, la fluorescence du conjugué fluorescent utilisé comme marqueur est émise directement par le marqueur fluorescent, après excitation à une longueur d'onde donnée.

Selon un autre aspect du procédé selon l'invention, on met en œuvre dans le dosage, outre ledit conjugué fluorescent, un autre marqueur fluorescent. Dans ce cas, la fluorescence mesurée dans le dosage est émise de manière indirecte par un transfert d'énergie non radiatif entre le conjugué après excitation dit « composé donneur » et une autre molécule fluorescente dite « composé accepteur ».

Dans ce cas particulier, les conditions suivantes sont remplies :

- d'une part, le composé fluorescent accepteur possède un spectre d'absorption qui recouvre au moins partiellement le spectre d'émission du donneur et présente une absorbance molaire élevée dans cette zone de recouvrement, et un spectre d'émission dans une gamme de longueur d'ondes où le donneur présente une émission intrinsèque faible ;

- d'autre part, l'accepteur et le donneur se situent à proximité l'un de l'autre, l'orientation de leurs dipôles de transition étant approximativement parallèles.

Le principe de la technique de transfert d'énergie non radiatif est décrit notamment dans G. Mathis et al., Clin. Chem., 1993, 39, 1953-1959.

Le cryptate de terre rare lié à l'oligonucléotide au sein du conjugué, qui est le composé fluorescent donneur, peut être dans ce cas un cryptate d'euprimum, et
 5 le composé fluorescent accepteur peut être par exemple choisi parmi l'allophycocyanine, l'allophycocyanine B, la C phycocyanine ou la R phycocyanine.

L'invention concerne, selon un aspect ultérieur, un conjugué fluorescent comprenant un oligonucléotide lié à un cryptate de terre rare, dans lequel l'oligonucléotide et le cryptate de terre rare sont tels que décrits plus haut.

10 L'invention est illustrée par les exemples ci-après, dans lesquels on utilisera les abréviations suivantes :

BSA : sérum albumine bovine

DTT : dithiothréitol

SMCC : ester de N-hydroxysuccinimide de l'acide 4-(maléimidométhyl)
 15 cyclohexanecarboxylique

SMP : ester de N-hydroxysuccinimide de l'acide 3-maléimidopropionique

SPDP : N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate

SVNN : sérum de veau nouveau-né

TEAB : hydrogénocarbonate de triéthylammonium

20 TEA Ac : Acétate de triéthylammonium contenant 10 % d'acétonitrile.

TCEP : Tris(2-carboxyéthyl)phosphine.

EXEMPLE 1. Propriétés photophysiques d'un cryptate [TBP-(Eu³⁺)] libre en présence de sérum:

25 Méthode A: Les spectres de fluorescences et les durées de vie sont mesurées sur un Spectrofluorimètre Perkin-Elmer de type LS50.

On prépare une solution mère (concentration de $9 \cdot 10^{-6}$ M dans du tampon phosphate 100 nM, pH 7) de cryptate [TBP-(Eu³⁺)]-diamine (purifié par RP-HPLC sur une colonne C-18 avec un gradient linéaire d'acétonitrile dans l'eau contenant 1
 30 % d'acide trifluoroacétique, puis séché sous vide) préparé par réaction de l'éthylènediamine sur le cryptate [(bis-bpy)-(bpy-dimethylester)] décrit dans l'exemple 4, section A de la demande EP 0 321 353. Dans les exemples suivants, ce cryptate [TBP-(Eu³⁺)]-diamine sera abrégé par K-NH₂.

- 1°) On dilue 200µl de cette solution mère dans 400µl de tampon phosphate 100mM pH7 et on mesure le spectre de fluorescence ($t_d = 0,1\text{ms}$, $t_g = 0,4\text{ms}$, $\lambda_{\text{excitation}} = 306\text{nm}$ $\lambda_{\text{émission}} = 540 \text{ à } 750\text{nm}$, fentes excitation/émission = 10/5, filtre jaune à l'émission) ainsi que la durée de vie t ($t_d = 0,1 \text{ à } 0,6 \text{ ms}$, $t_g = 0,4\text{ms}$, $\lambda_{\text{excitation}} = 306\text{nm}$ $\lambda_{\text{émission}} = 620\text{nm}$, fentes excitation/émission = 10/5, filtre jaune à l'émission):

On observe que la raie principale ($\lambda_{\text{em}} = 616\text{nm}$) présente une durée de vie dans le tampon phosphate de $t_p = 0,60\text{ms}$ (Coefficient de Corrélation C.C = 0,999).

- 2°) On dilue 200µl de cette solution mère de K-NH₂ dans un mélange de 200µl de tampon phosphate 100mM pH7 et de 200µl de SVNN et on mesure le spectre et la durée de vie dans les même conditions.

On observe que la raie principale ($\lambda_{\text{em}} = 616\text{nm}$) présente une durée de vie dans le tampon phosphate de $t_s = 0,15\text{ms}$ (C.C = 0,991).

- Le facteur d'extinction est donné par l'expression $Q = 100 - 100(t_s/t_p)$ soit $Q = 100 - 100(0,15/0,60) = 75$ soit 75% d'extinction.

Méthode B :

- On prépare une solution mère de cryptate [TBP-(Eu³⁺)]-diamine dans du tampon phosphate 100mM à une concentration de $1,8 \cdot 10^{-8} \text{ M}$.

On remplit les puits d'une microplaque à fond noir (HTRF 96 puits, Packard) selon le protocole suivant :

- Conditions 1 : On mélange 100µl de solution mère de cryptate avec 100µl de tampon phosphate 100mM pH7 et 100µl de tampon phosphate 100mM pH7 contenant 0,15M NaCl et 0,1% BSA, les mesures sont effectuées en doublet. Ce milieu permet de constituer une référence.

Conditions 2 : On mélange 100µl de solution mère de cryptate avec 100µl de SVNN et 200µl de tampon phosphate 100mM pH7 contenant 0,15M NaCl et 0,1% BSA (mesure en doublet).

- On mesure la fluorescence en temps résolu sur un appareil DISCOVERY (Packard) utilisant une excitation laser à 337nm et une fenêtre d'acquisition de 50µs à 400µs.

Dans le tampon phosphate seul (conditions 1), on observe que l'intensité de l'émission à 620nm est de $1,41 \cdot 10^5$ ufa (unités de fluorescence arbitraires). Dans

les puits adjacents d'une même microplaque, les solutions contenant du sérum (conditions 2) présentent une intensité de l'émission à 620nm de $2,9 \cdot 10^4$ ufa.

La baisse de l'intensité du signal à 620nm en présence de sérum par rapport à la référence dans le tampon phosphate permet de mettre en évidence le phénomène d'extinction provoqué par le sérum.

$$100 - 100[E620(\text{sérum}) / E620(\text{réf})] = 100 - 100(2,9 \cdot 10^4 / 1,41 \cdot 10^5) = 80\%$$

Cette méthode permet une estimation globale de la diminution du signal provenant soit d'une diminution de la durée de vie soit d'une diminution de l'émission à 620nm.

Elle permet de travailler à des concentrations plus faibles comparativement à la méthode A et elle permet une mesure simultanée de plusieurs échantillons en se plaçant dans des conditions les plus proches possible de celles rencontrées dans un immuno-essai.

EXEMPLE 2. Synthèse et purification d'un conjugué oligodésoxynucléotide-cryptate [TBP-(Eu³⁺)]:

1°) Synthèse d'un oligodésoxynucléotide fonctionnalisé par un bras aminohexyl (AH-ODN1):

Un oligodésoxynucléotide (ODN) de séquence $5'\text{-}^{\text{AH}}\text{C ACG CCA CTA GCT CC-}_3'$ modifié en son extrémité 5' par un bras aminohexyl (AH) est synthétisé sur support solide par la méthode dénommée « phosphite-phosphoramidite » en utilisant un synthétiseur d'ADN (Applied Biosystems type 392) selon le protocole du fabricant. Un nucléotide modifié est introduit en 5' par couplage d'un dérivé N,N-diisopropyl-β-cyanoéthyl-phosphoramidite obtenu à partir de la 5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-N-4-(6-Trifluoracétamidoheptyl)-2'-désoxycytidine préparée par trifluoracétylation de la 5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-N-4-(6-Aminohexyl)-2'-désoxycytidine comme décrit dans ROGET et al. Nucleic Acids Res., 17, 7643-7650, (1989).

Après synthèse sur un synthétiseur d'ADN (Applied Biosystem 392) en mode "trityl-on" suivant le guide utilisateur correspondant, l'oligonucléotide est traité par l'ammoniaque concentrée (16h à 55°C) et purifié par HPLC sur une colonne LiChrospher^R RP-18E 250-10 (10µm)(Merck, Darmstadt, D) par un gradient d'acétonitrile dans l'acétate de triéthylammonium 50 mM (tampon A: 5% acétonitrile, tampon B: 50% acétonitrile; débit 5ml/min, gradient de 10% B à 60% B en 20min,

isocratique 60% B pendant 5min, puis gradient de 60% B à 100% B en 5min). Selon la méthode décrite dans Oligonucleotide synthesis : A practical approach. Ed M.J. Gait. IRL Press, Oxford. Les fractions correspondant à un pic majoritaire (temps de rétention supérieur à 20min) sont évaporées. Après évaporation et co-
 5 évaporation avec de l'eau, l'oligonucléotide partiellement déprotégé ainsi obtenu est détritilé par l'acide acétique à 80% (température ambiante, 30min) puis, après évaporation et coévaporation, l'oligonucléotide complètement déprotégé est repris dans 50µl d'hydrogénocarbonate de triéthylammonium (TEAB) 100mM pH 8 et précipité par 1,5ml de n-butanol. Après centrifugation le surnageant est éliminé et le
 10 précipité séché sous vide est repris par 200µl d'eau. Cette solution mère (oligonucléotide dénommé AH-ODN1) présente une absorption de 37 UA₂₆₀/ml.

2°) Couplage d'une molécule de cryptate [TBP-(Eu3+)] sur un oligodésoxynucléotide fonctionnalisé par un bras aminohexyl (AH-ODN1):

15 Une partie aliquote (150µl) de la solution mère de l'oligonucléotide obtenu ci-dessus (5,5 UA₂₆₀ soit environ 39 nmol) est diluée par 150µl d'une solution aqueuse de TEAB 0,1 M pH 7,8 et on ajoute 60 µl d'une solution de cryptate [TBP-(Eu3+)] activé (4 mg/ml) soit 171 nmol (environ 4 équivalents). Le cryptate [TBP-(Eu3+)] activé (N-hydroxysuccinimide/dicyclohexylcarbodiimide) est préparée
 20 extemporanément à partir de cryptate d'Europium [(bis-bipy)-(bipy-diacide)] lui-même obtenu à partir du cryptate d'Europium [(bis-bipy)-(bipy-dimethylester)] décrit dans l'exemple 4, section A, de la demande EP 0 321 353.

Après 30 min sous agitation, on ajoute 15µl de TEAB 1M pH 8,5 puis évapore sous vide (speed-vac) jusqu'à un volume de 200 µl, on dépose sur une
 25 colonne NAP10 (Pharmacia) équilibrée dans un tampon TEAAc 25mM pH7 contenant 10% d'acétonitrile, on élue par le même tampon selon le protocole du fabricant, la fraction exclue est collectée dans un volume de 1ml, cette fraction est concentrée (speed-vac) jusqu'à un volume de 200µl.

3°) Purification d'un conjugué formé d'un cryptate [TBP-(Eu3+)] et d'un
 30 oligodésoxynucléotide fonctionnalisé par un bras aminohexyl (Conjugué KH-ODN1):

Le conjugué KH-ODN1 est analysé par FPLC sur une colonne mono-Q (Pharmacia) en utilisant les conditions suivantes (tampon C : sodium acétate 20mM pH 5 contenant 10% d'acétonitrile. tampon D : sodium acétate 20mM pH 5 lithium

chlorure 1M contenant 10% d'acétonitrile. Gradient : 0 à 2 min isocratique 20% D, 2 min à 30 min gradient de 20% D à 60% D, débit 1ml/mln).

L'oligonucléotide AH-ODN1 analysé par FPLC dans les conditions ci-dessus présente un temps de rétention $R_t = 16,4$ min. Dans les mêmes conditions
5 le conjugué KH-ODN1 présente un temps de rétention $R_t = 15,4$ min.

On injecte ensuite la totalité de la fraction exclue provenant de la colonne NAP10 (200 μ l) sur la colonne mono-Q, la fraction correspondant à un temps de rétention de 15 min est collectée, concentrée jusqu'à 300 μ l et dessalée sur une
10 colonne NAP10 équilibrée dans un tampon TEAAc 25mM pH7 contenant 10% d'acétonitrile. On élue par le même tampon selon le protocole du fabricant et la fraction exclue est collectée dans un volume de 1 ml. Cette fraction correspond au conjugué KH-ODN1 pur et est caractérisé par un spectre ultra-violet présentant un maximum à 258 nm (composante ODN) est un épaulement vers 305 nm (composante cryptate), le rapport des absorbances $A_{260}/A_{305} = 4,46$ est proche du
15 rapport théorique obtenu en faisant le rapport des absorbances molaires des composants du conjugué pris isolément $\epsilon_{260}(\text{ODN}) + \epsilon_{260}(\text{cryptate}) / \epsilon_{305}(\text{cryptate}) = (135\,000 + 19\,000) / 30\,000 \simeq 5$.

La structure du conjugué KH-ODN1 est représentée sur la Figure 1.

20 4°) Synthèse d'un conjugué cryptate-Oligonucléotide (K-ODN2) :

On répète la synthèse suivant le protocole ci-dessus en construisant la séquence oligonucléotidique GGG GGT TTT TTT TTT (G_5T_{10}) à la place de ACG CCA CTA GCT CC.

25 **EXEMPLE 3. Propriétés photophysiques d'un conjugué Oligonucléotide-cryptate [TBP-(Eu3+)] en présence de sérum:**

Méthode A: Les spectres de fluorescences et les durées de vie sont mesurées sur un Spectrofluorimètre Perkin-Elmer de type LS50.

30 On utilise la solution mère de conjugué oligonucléotide-cryptate [TBP-(Eu3+)] obtenue dans l'exemple 2 (3°). En considérant la concentration estimée par mesure d'absorbance $\epsilon_{260}(\text{conjugué}) = \epsilon_{260}(\text{ODN}) + \epsilon_{260}(\text{cryptate}) \simeq (154\,000)$ est de $3,5 \cdot 10^{-6}$ M.

1°) On dilue 200 µl de cette solution mère, soit dans l'eau, soit dans 400 µl de tampon phosphate 100mM pH7 et on mesure le spectre de fluorescence ($t_d = 0,1\text{ms}$, $t_g = 0,4\text{ms}$, $\lambda_{\text{excitation}} = 306\text{nm}$ $\lambda_{\text{émission}} = 540$ à 750nm , fentes excitation/émission = 10/5, filtre jaune à l'émission) ainsi que la durée de vie t (5 $t_d = 0,1$ à $0,6\text{ ms}$, $t_g = 0,4\text{ms}$, $\lambda_{\text{excitation}} = 306\text{nm}$ $\lambda_{\text{émission}} = 620\text{nm}$, fentes excitation/émission = 10/5, filtre jaune à l'émission):

Dans l'eau ou dans du tampon phosphate, on observe un profil de spectre différent de celui habituellement observé pour le cryptate [TBP-(Eu3+)]-diamine : la raie principale ($\lambda_{\text{em}} = 620\text{nm}$) présente une durée de vie de $t_p = 1,1\text{ms}$ (Coefficient de Corrélation C.C = 0,999). (10

2°) On dilue 200µl de cette solution mère dans un mélange de 200µl de tampon phosphate 100mM pH7 et de 200µl de SVNN et on mesure le spectre et la durée de vie dans les mêmes conditions.

On observe que la raie principale ($\lambda_{\text{em}} = 620\text{nm}$) présente une durée de vie dans le tampon phosphate de $t_s = 1,1\text{ms}$ (C.C = 0,99). (15

Dans ce cas aucune extinction par diminution de la durée de vie n'est observée.

20 Méthode B :

On utilise la solution mère de conjugué oligonucléotide-cryptate [TBP-(Eu3+)] à obtenue dans l'exemple 2 (3°). Par mesure d'absorbance à 260nm, on estime la concentration à $3,5 \cdot 10^{-8}\text{ M}$. On dilue cette solution mère dans du tampon phosphate 100mM afin d'obtenir une concentration finale de $2 \cdot 10^{-8}\text{ M}$.

On remplit les puits d'une microplaque à fond noir (HTRF 96 puits, Packard) selon le protocole suivant :

Conditions 1 : On mélange 100µl de solution mère de conjugué K-ODN1 avec 100µl de tampon phosphate 100mM pH7 et 200µl de tampon phosphate 100mM pH7 contenant 0,15M NaCl et 0,1% BSA, les mesures sont effectuées en (30 doublet. Ce milieu permet de constituer une référence.

Conditions 2 : On mélange 100µl de solution mère de conjugué K-ODN1 avec 100µl de SVNN et 100µl de tampon phosphate 100mM pH7 contenant 0,15M NaCl et 0,1% BSA (mesure en doublet).

On mesure la fluorescence en temps résolu sur un appareil DISCOVERY (Packard) utilisant une excitation laser à 337nm et une fenêtre d'acquisition de 50µs à 400µs.

Dans le tampon phosphate seul (conditions 1), on observe que l'intensité de l'émission à 620nm est de $2,8 \cdot 10^5$ ufa (unités de fluorescence arbitraire). Dans les puits adjacents d'une même microplaque, les solutions contenant du sérum (conditions 2) présentent une intensité de l'émission à 620nm de $2,8 \cdot 10^5$ ufa.

Dans ce cas on n'observe pas de baisse de l'intensité du signal à 620nm en présence de sérum par rapport à la référence dans le tampon phosphate. Il n'y a donc pas de phénomène d'extinction provoqué par le sérum.

L'extinction mesurée par la relation suivante est de :

$$100 - 100[\epsilon_{620}(\text{sérum}) / \epsilon_{620}(\text{réf})] = 100 - 100(2,8 \cdot 10^5 / 2,8 \cdot 10^5) = 0\%$$

EXEMPLE 4. Propriétés photophysiques comparées d'un conjugué Oligonucléotide-cryptate et d'un cryptate [TBP-(Eu³⁺)] de référence, en présence d'acide urique:

Cet exemple est utilisé pour comparer l'effet de l'acide urique sur les propriétés photophysiques de différentes molécules contenant un motif cryptate d'euporium.

Dans une série de puits d'une microplaque, on pipette des volumes identiques (100µl) soit d'une solution de conjugué marqué au cryptate (environ $2 \cdot 10^{-8}$ M, voir exemple 3B) que l'on veut évaluer, soit d'une solution de cryptate de référence (environ $2 \cdot 10^{-8}$ M, voir ex 1B).

Dans chaque série de puits on ajoute dans le premier puits (standard 0) 200µl de tampon phosphate 100mM pH7 contenant 0,15M NaCl et 0,1% BSA et dans les puits suivant 200µl de solutions contenant des concentrations croissantes d'acide urique dans le même tampon (afin d'obtenir par exemple des concentrations finale de 0, 5, 10, 20, 40 et 80 mg/l d'acide urique).

On mesure la fluorescence en temps résolu sur un appareil DISCOVERY (Packard) utilisant une excitation laser à 337nm et une fenêtre d'acquisition de 50µs à 400µs.

Pour chaque série on mesure l'intensité de l'émission à 620nm pour le standard 0 ainsi que pour chaque concentration en acide urique. Pour chaque concentration on évalue le pourcentage d'extinction par la relation suivante:

$$100 - 100[\epsilon_{620}(\text{ac. urique}) / \epsilon_{620}(\text{standard 0})]$$

5 Les résultats sont regroupés dans le tableau I.

TABLEAU 1

[Acide urique] en mg/l	% d'extinction à 620 nm	
	K-NH2	K-G5T10
0	0	0
1,25	47	8
2,5	66	20
5	79	28
10	86	30
20	88	36
40	89	40
80	90	46

10 On observe que le pourcentage d'extinction du cryptate libre de référence augmente fortement en fonction de la concentration en acide urique. Par contre le pourcentage d'extinction des conjugués cryptate-oligonucléotide est significativement plus bas même pour les fortes concentration en acide urique.

15 En effet, à la concentration de 5mg/ml le cryptate K-NH2 de référence présente une extinction de 79% alors que dans les mêmes conditions le conjugué cryptate-oligonucléotide K-ODN2 ne présente que 28% d'extinction.

EXEMPLE 5. Synthèse et purification d'un conjugué cryptate[TBP-(Eu3+)]-aminohexyl-oligonucléotide-Maléimide:

Synthèse d'un oligonucléotide de séquence G_5T_{10} fonctionnalisé en son
 5 extrémité 5' par un cryptate et en son extrémité 3' par un bras portant un groupe réactif maléimide ($5'K-AH\ GGG\ GGT\ TTT\ TTT\ TT^{MCCAHC}\ T_{-3}$).

La synthèse est réalisée à partir d'un oligonucléotide portant deux bras aminohexyl dont un est protégé (structure générale $MMT-NH-(CH_2)_6-(5'ODN_3)-(CH_2)_6-NH_2$ suivant le schéma ci-après.

10 $MMT-AH\ GGG\ GGT\ TTT\ TTT\ TT^{AH}CT \rightarrow 5'MMT-AH\ GGG\ GGT\ TTT\ TTT\ TT^{MCCAHC}CT$
 $\rightarrow 5'AH\ GGG\ GGT\ TTT\ TTT\ TT^{MCCAHC}CT \rightarrow (5'K-AH\ GGG\ GGT\ TTT\ TTT\ TT^{MCCAHC}\ T_{-3})$

Un oligodésoxynucléotide (ODN) de séquence $5'MMT-AH\ GGG\ GGT\ TTT\ TTT\ TT^{AH}C\ T_{-3}$ modifié en son extrémité 5' par un bras aminohexyl (AH) sous sa forme protégée par un groupe Monométhoxytrityl (MMT) est synthétisé suivant le
 15 procédé suivant :

Par un procédé similaire à l'exemple 1 (1°), sur une colonne T (1 μ mol), on couple le dérivé N,N-diisopropyl- β -cyanoethyl-phosphoramidite de la 5'-O-(4,4'-diméthoxytrityl)-N-4-(6-Trifluoracétamidohexyl)-2'-désoxycytidine, ensuite on poursuit la synthèse en construisant la séquence GGG GGT TTT TTT TT, et
 20 finalement on effectue le couplage d'un dérivé Monométhoxytrityl-aminohexyl-phosphoramidite (MMT-C6—Aminomodifier, Cruachem) en utilisant l'option « trityl-ON » du synthétiseur. L'oligonucléotide $5'MMT-AH\ GGG\ GGT\ TTT\ TTT\ TT^{AH}CT$ est traité par l'ammoniaque concentrée (16h à 55°C) et purifié par HPLC selon le protocole de l'exemple 1 (1°).

25 L'oligonucléotide partiellement déprotégé ainsi obtenu est concentré (speed-vac), une partie aliquote (0,24 μ mol) est reprise par 100 μ l de tampon phosphate 0,1M pH 8 et traité par 5mg de SMCC (15 μ mol) dans 100 μ l d'acétonitrile, Sigma). Après 40 min sous agitation à température ambiante, le mélange est concentré de moitié (speed-vac) et déssalé sur colonne NAP10
 30 équilibrée dans TEAAc 25mM pH7 5% d'acétonitrile. La fraction exclue (1ml) contenant l'oligonucléotide de structure $5'MMT-AH\ GGG\ GGT\ TTT\ TTT\ TT^{MCCAHC}CT$ est évaporé à sec, le résidu est repris par 1 ml d'acide acétique à 80% après 20 min à température ambiante le mélange est concentré et co-évaporé (spe d-vac)

par d l'eau puis repris dans 300 µl d'eau. On obtient à ce stade l'oligonucléotide détritilé de structure suivante $5'\text{AH GGG GGT TTT TTT TT}^{\text{MCC-AH}}\text{CT}$.

Cet oligonucléotide (0,175 µmol dans 300µl) est dilué par 300µl de TEAB 0,1M pH7 puis on ajoute 450µl (1,27 nmol soit ~ 7 eq.) d'une solution de cryptate
 5 [TBP-(Eu3+)] activé (4 mg/ml) comme décrit dans l'exemple 2.

Après 30min sous agitation on évapore sous vide (speed-vac) jusqu'à un volume de 200 µl, on dépose sur une colonne NAP10 (Pharmacia) équilibrée dans un tampon TEAAc 25mM pH7 contenant 10% d'acétonitrile et on élue par le même
 10 tampon selon le protocole du fabricant. La fraction exclue est collectée dans un volume de 1ml et concentrée (speed-vac) jusqu'à un volume de 200µl. La fraction exclue contient principalement l'oligonucléotide marqué de structure ($5'\text{-K-AH GGG GGT TTT TTT TT}^{\text{MCC-AH}}\text{C T}_{-3}$), cet oligonucléotide est ensuite purifié par injection sur une colonne HR 10/30 remplie de Sephadex G25 éluee par du tampon phosphate 0,1M pH7 avec un débit de 1ml/min. On collecte la fraction éluee entre 8 et
 15 11 min. On obtient ainsi 3 ml d'une solution contenant 17,5 nmol de l'oligonucléotide $5'\text{-K-AH GGG GGT TTT TTT TT}^{\text{MCC-AH}}\text{C T}_{-3}$ pur directement utilisable pour être couplé sur les fonctions thiol d'une protéine. (rapport $A_{260}/A_{305} = 7$).

**EXEMPLE 6. Couplage d'un conjugué cryptate[TBP-(Eu3+)]-aminohexyl-
 20 oligonucléotide-maléimide sur un anticorps:**

Un anticorps est fonctionnalisé par du SPDP (Pierce), après réduction par du DTT, l'anticorps activé est purifié sur une colonne HR 10/30 remplie de
 25 Sephadex G25 éluee par du tampon phosphate 0,1M pH7 avec un débit de 1ml/min. La fraction contenant l'anticorps activé est combinée avec un conjugué cryptate-oligonucléotide activé par un groupe maléimide $5'\text{-K-AH GGG GGT TTT TTT TT}^{\text{MCC-AH}}\text{C T}_{-3}$ préparé selon l'exemple 5. Le mélange réactionnel est ensuite purifié sur une colonne Superdex 200 éluee comme ci-dessus, la fraction contenant le conjugué anticorps-oligonucléotide-cryptate est collectée.

EXEMPLE 7. Couplage d'un conjugué cryptate[TBP-(Eu3+)]-aminohexyl-oligonucléotide-maléimide sur de la streptavidine :

La streptavidine est activée comme dans l'exemple 6 et elle est ensuite
 5 marquée à l'aide d'un conjugué cryptate-oligonucléotide activé par un groupe maléimide $5'$ -K-AH GGG GGT TTT TTT TT^{MCC-AH} C T₋₃, préparé selon l'exemple 5.

EXEMPLE 8. Propriétés photophysiques d'un conjugué protéine-oligonucléotide-cryptate [TBP-(Eu3+)]:

10

On évalue le pourcentage d'extinction en présence d'acide urique en suivant le protocole de l'exemple 4.

On évalue ainsi un conjugué cryptate[TBP-(Eu3+)]-oligonucléotide-anticorps préparé selon le protocole de l'exemple 6 par rapport à un cryptate[TBP-(Eu3+)]-anticorps de référence préparé par marquage d'un anticorps à l'aide de
 15 cryptate (activé par du SMCC) en suivant un protocole classique d'immunochimie.

On évalue également un conjugué cryptate[TBP-(Eu3+)]-oligonucléotide-streptavidine préparé selon l'exemple 7 par rapport à un cryptate[TBP-(Eu3+)]-streptavidine de référence préparé par marquage de streptavidine à l'aide de
 20 cryptate (activé par du SMCC) en suivant un protocole classique d'immunochimie.

Les résultats sont regroupés dans le tableau 2.

TABLEAU 2

[Acide urique] en mg/l	Pourcentage d'extinction du signal du cryptate trisbipyridine à 620 nm	
	Conjugué anti-prolactine cryptate trisbipyridine	Conjugué anti-prolactine oligonucléotide cryptate trisbipyridine
0	0	0
5	46	2
10	61	9
20	71	15
40	82	20
80	86	28

[Acide urique] en mg/l	Pourcentage d'extinction du signal du cryptate trisbipyridine à 620 nm	
	Conjugué streptavidine cryptate trisbipyridine	Conjugué streptavidine oligonucléotide cryptate trisbipyridine
0	0	0
5	74	10
10	88	11
20	94	18
40	97	23
80	97	32

On observe que pour les fortes concentrations en acide urique le conjugué cryptate-anticorps de référence présente une extinction de 86% alors que dans les mêmes conditions, le conjugué cryptate-oligonucléotide-anticorps ne présente que 28% d'extinction. Pour une concentration en acide urique voisine entre 5 et 10mg/ml la fluorescence du conjugué de référence est atténuée de 50% alors que le composé de l'invention présente moins de 10% d'extinction.

On observe de façon analogue que le conjugué cryptate-streptavidine de référence présente dans les conditions de forte concentration en acide urique une extinction de 97% alors que le conjugué cryptate-oligonucléotide-streptavidine ne présente que 32 % d'extinction.

EXEMPLE 9. Couplage d'un conjugué cryptate[TBP-(Eu³⁺)]-maléimide sur un oligonucléotide-thiol:

Le cryptate [(bis-bipy)-(bipy-dimethylester)] décrit dans l'exemple 4, section A, de la demande EP 0 321 353 est traité par de l'éthylène diamine et le cryptate-diamine résultant purifié par RP-HPLC est ensuite traité par du SMCC (Pierce) ou du SMP (Pierce) pour introduire un groupe maléimide. On obtient ainsi un conjugué cryptate-maléimide. Ce conjugué cryptate maléimide, purifié sur RP-HPLC est couplé sur un oligonucléotide-thiol (ODN4 ci-dessous).

L'oligonucléotide utilisé possède la structure suivante :

ODN3 : DMT-O(CH₂)₆-SS-(CH₂)₆-p-d(TTT TTT TTT GGG GG^{AH}CG)₃.

La fonction thiol est introduite en 5' de l'oligonucléotide sous la forme d'un pont disulfure. Cette fonctionnalisation est introduite à la fin en position 5' de l'oligonucléotide par un phosphoramidite (C6-disulphide phosphoramidite, Cruachem Ltd., Glasgow). Après déprotection ammoniacale et purification (RP-HPLC) l'oligonucléotide est traité par le TCEP (Pierce, Rockford, IL) afin de libérer la fonction thiol.

On obtient ainsi l'oligonucléotide de structure :

10 ODN4 : HS-(CH₂)₆-p-d(TTT TTT TTT GGG GG^{AH}CG)₃.

On ajoute 15µl d'une solution d'ODN3 à 156 UA₂₆₀/ml à 85µl d'eau, on ajoute 50µl d'une solution de TCEP à 1mg/ml, après 20min à 20°C on dépose sur une colonne NAP 10 (équilibrée dans TEAAc 25mM pH7 5% acétonitrile) on élue la colonne et collecte le volume d'exclusion (1ml contenant environ 9nmol d'ODN4) 15 concentre au speed-vac (jusqu'à environ 100µl) et on ajoute 13 nmol de cryptate-maléimide dans 50µl d'eau. Après une nuit de couplage à 4°C, le mélange est purifié sur NAP10 (élution comme ci-dessus) et le conjugué oligonucléotide-cryptate est élué dans le volume d'exclusion (1ml). On vérifie par FPLC analytique l'absence de cryptate libre (colonne HR10/30 remplie de Sepharose G25 (Pharmacia), élution 20 par tampon phosphate 10mM pH 7).

On obtient ainsi le conjugué oligonucléotide-cryptate[TBP-Eu³⁺] de structure [bpy.bpy.bpy-Eu³⁺]-S-(CH₂)₆-p-d(TTT TTT TTT GGG GG^{AH}CG)₃, qui possède près de l'extrémité 3' un bras aminohexyl permettant de lier ce conjugué à une biomolécule.

25

EXEMPLE 10. Propriétés photophysiques d'un conjugué Oligonucléotide-cryptate [TBP-Eu³⁺]). obtenu selon l'exemple 9:

A. Durée de vie :

30 On effectue la mesure de la durée de vie sur une dilution dans l'eau du conjugué cryptate-oligonucléotide obtenu dans l'exemple 9 en utilisant le protocole de l'exemple 3 (méthode A).

On observe que dans l'eau ou dans le tampon phosphate, la raie principale(λ_{em} = 620nm) présente une durée de vie de t_p = 1,33ms (Coefficient de

Corrélation C.C = 0,999), cette durée de vie élevée est à rapprocher de la valeur de 1,1ms (exemple 3A) obtenue pour le conjugué cryptate-oligonucléotide dont la synthèse est décrite dans l'exemple 2.

B. Extinction par l'acide urique :

5 On évalue le pourcentage d'extinction par l'acide urique comme décrit dans l'exemple 4 afin d'obtenir des concentrations finale de 0, 2,5, 5, 10, 20, 40 et 80 mg/l d'acide urique.

On traite de la même façon un échantillon référence de cryptate libre.

Les résultats sont rapportés dans le tableau 3 ci-dessous :

10

TABLEAU 3

Acide urique (mg/ml)	Cryptate libre Extinction à 620nm (%)	Conjugué de l'ex. 9 Extinction à 620nm (%)
0	0	0
2,5	81	32
5	92	38
10	97	43
20	98	46
40	98	47
80	98	53

15 On observe que la structure du conjugué cryptate oligonucléotide confère une résistance à l'extinction par l'acide urique du même ordre que ce qui a été observé pour le conjugué de l'exemple 2.

De même la mesure de la durée de vie selon l'exemple 3A montre que la raie principale ($\lambda_{em} = 620nm$) présente une durée de vie dans le tampon phosphate de $t_s = 1,1ms$ (C.C = 0,99).

20 Par conséquent, la façon de créer la liaison covalente entre l'unité cryptate et l'oligonucléotide n'influe pas de façon sensible sur les propriétés photophysiques des conjugués.

EXEMPLE 11. Couplage d'un conjugué cryptate[bis-diéthoxybpy.bpy-(Eu³⁺)]-maléimid sur un olig nucléotide-thi I:

Dans cet exemple on utilise un cryptate formé de deux unités 4,4'-diéthoxy-
 5 2,2'-bipyridines et d'une unité 4,4'-di-méthylcarboxylate-2,2'-bipyridine. La synthèse
 de ce cryptate est faite selon le procédé décrit dans la demande EP 0 321 353, par
 condensation, en présence de carbonate de sodium dans l'acétonitrile à reflux, de 2
 équivalents de 6,6'-dibromométhyl-4,4'-diéthoxy-2,2'-2,2'-bipyridine et 1 équivalent
 de dérivé 6,6'-di-aminométhyl-4,4'-diméthylcarboxylate-2,2'-bipyridine. On obtient
 10 ainsi le cryptate [bis-diéthoxybpy. diCOOCH₃bpy]NaBr. Ce cryptate de sodium est
 ensuite converti en cryptate d'euporium [bis-diéthoxybpy.diCOOCH₃bpy-Eu³⁺] par
 EuCl₃.6H₂O dans le méthanol à reflux. Ce cryptate-diméthylester d'euporium est
 ensuite traité par de l'éthylène diamine (4h à 20°C), le cryptate-diamine d'euporium
 [bis-diéthoxybpy.(di-NH₂(CH₂)₂-NHCO-bpy)-Eu³⁺] résultant est purifié par RP-HPLC.
 15 Ce cryptate servira de cryptate de référence et sera appelé K'NH2 dans
 l'exemple 12 ci-dessous. Il est ensuite traité par du SMP (Pierce) pour introduire un
 groupe maléimide. On obtient ainsi un conjugué cryptate [bis-diéthoxybpy.bipy-Eu³⁺]-
 maléimide. Ce conjugué cryptate-maléimide, purifié sur RP-HPLC est couplé selon le
 protocole de l'exemple 9 sur l'oligonucléotide-thiol ODN4 décrit dans cet exemple. On
 20 obtient ainsi un conjugué oligonucléotide-[bis-diéthoxybpy.bpy-(Eu³⁺)]. Le spectre UV
 de ce conjugué présente un maximum vers 260nm correspondant à l'oligonucléotide
 et 2 épaulements vers 305 nm et 337nm correspondant à la partie cryptate.

**EXEMPLE-12. Propriétés photophysiques du conjugué oligonucléotide-
 25 cryptate[bis-diéthoxybpy.bpy-(Eu³⁺)] obtenu selon l'exemple 11 :**

On effectue les mesures de durée de vie du conjugué oligonucléotide-
 cryptate[bis-diéthoxybpy.bpy-(Eu³⁺)] (exemple 11) dans le tampon phosphate,
 selon le protocole décrit dans l'exemple et en utilisant comme cryptate de référence
 30 le composé K'NH2 décrit dans l'exemple 11.

Les résultats sont rapportés dans le tableau 4 ci-dessous :

TABLEAU 4

Milieu	Conjugué oligonucléotide- cryptate[bis-diethoxybpy.bpy- (Eu3+)]	K'NH2
	Durée de vie (ms)	Durée de vie (ms)
Phosphate	0,8	0,6
Phosphate + sérum	0,8	0,2

- On observe donc que le K'NH2 de référence mis en présence de sérum montre un phénomène d'extinction qui se traduit par une baisse significative de la durée de vie en comparaison avec la valeur observée dans le phosphate seul.
- 5

On observe que le conjugué oligonucléotide-cryptate[bis-diethoxybpy.bpy-(Eu3+)] n'est pas affecté par le sérum.

Cet exemple montre que l'effet protecteur de la partie oligonucléotide est indépendante de la structure du cryptate.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de réduction de l'extinction de fluorescence due au milieu de mesure dans un dosage par fluorescence d'un analyte mettant en œuvre au moins
5 un marqueur fluorescent, caractérisé en ce qu'on introduit dans le milieu de mesure un conjugué fluorescent comprenant un oligonucléotide lié à un cryptate de terre rare.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que
10 l'oligonucléotide est constitué d'un enchaînement d'unités ribonucléotides ou désoxyribonucléotides liées entre elles par des liaisons de type phosphodiester.

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que
15 l'oligonucléotide est constitué d'un enchaînement d'unités ribonucléotides ou désoxyribonucléotides ou d'unités analogues de nucléotide modifiées sur le sucre ou sur la base, liées entre elles par des liaisons internucléotidiques naturelles de type phosphodiester, une partie des liaisons internucléotidiques étant éventuellement remplacée par des liaisons phosphonate, phosphoramide ou phosphorothioate.

4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que
20 l'oligonucléotide est constitué d'un enchaînement comprenant à la fois des unités ribonucléotides ou désoxyribonucléotides liées entre elles par des liaisons de type phosphodiester et des unités analogues de nucléosides liées entre elles par des liaisons amide.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé
25 en ce que l'oligonucléotide est constitué d'unités ribonucléotides ou désoxyribonucléotides, dont l'une au moins peut comporter un groupe fonctionnel introduit ou généré sur ladite unité ou un groupe fonctionnel introduit à l'aide d'un bras d'espacement lié au groupement phosphate terminal en position 3' ou 5'.

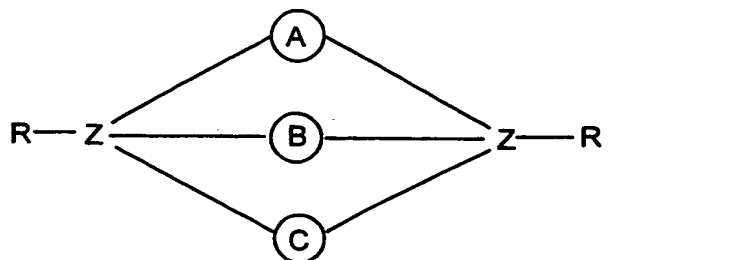
6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que ladite unité est l'unité 5' terminale ou 3' terminale.

30 7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'oligonucléotide comprend un enchaînement de 5 à 50 nucléotides ou un enchaînement de 5 à 50 nucléotides et analogues de nucléotides, ou de nucléosides.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'oligonucléotide est constitué d'un enchaînement d'unités ribonucléotides ou désoxyribonucléotides liées entre elles par des liaisons de type phosphodiester et d'unités analogues de nucléosides liées entre elles par des liaisons amide, ledit
- 5 oligonucléotide comprenant au moins 5 liaisons internucléotidiques de type phosphodiester à l'extrémité destinée à être liée au cryptate.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le cryptate de terre rare est lié de manière covalente à l'oligonucléotide soit directement, soit par l'intermédiaire d'un bras d'espacement.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que ledit cryptate de terre rare est constitué d'au moins un sel de terre rare complexé par un composé macropolycyclique de formule



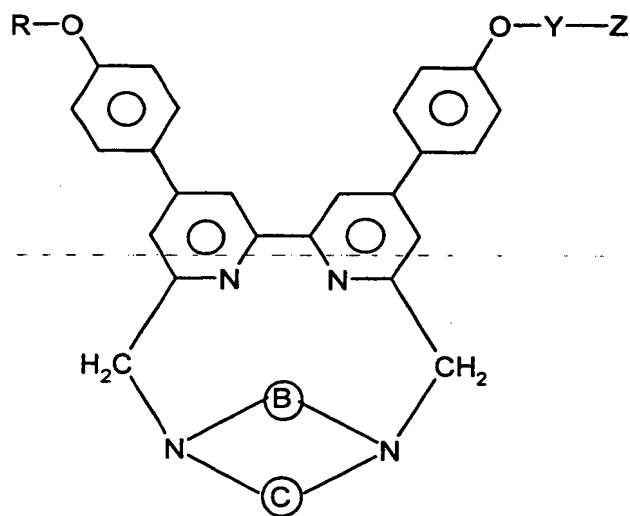
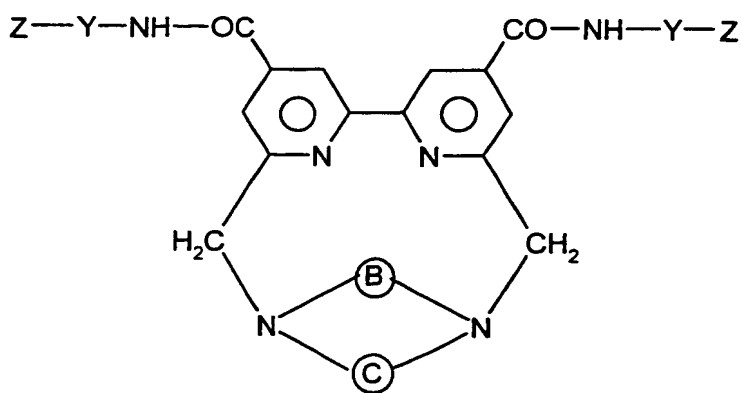
- 15 dans laquelle Z est un atome ayant 3 ou 4 valences, R est rien ou représente l'hydrogène, le groupe hydroxy, un groupe amino ou un radical hydrocarboné, les radicaux bivalents (A), (B) et (C), sont indépendamment l'un de l'autre des chaînes hydrocarbonées qui contiennent éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes et sont éventuellement interrompues par un
- 20 hétéromacrocycle, au moins l'un des radicaux (A), (B) et (C) comportant de plus au moins un motif moléculaire ou étant essentiellement constitué par un motif moléculaire, ledit motif moléculaire possédant une énergie de triplet supérieure à celle du niveau émissif de l'ion de terre rare complexé.

11. Procédé selon la revendications 10, caractérisé en ce que le cryptate de terre rare est constitué d'un sel de terre rare complexé par l'un des composés macropolycycliques ou macropolycycliques ci-après :

(22)phénanthroline ; (22)phénanthroline amide ; (22)anthracène ;
 (22)anthracène amide ; (22)bi-isoquinoléin ; (22)biphényl-bis-pyridine ;
 (22)bipyridine ; (22)bi-pyridine amide ; les macropolycycles tris-bipyridine, tris-

phénanthroline, phénanthroline-bis-bipyridine, bi-isoquinoléine-bis-bipyridine, bis-bipyridine diphénylbipyridine ; un composé macropolycyclique comprenant un motif moléculaire choisi parmi les bipyrazines, les bipyrimidines et les hétérocycles azotés comportant des groupements N-oxydes.

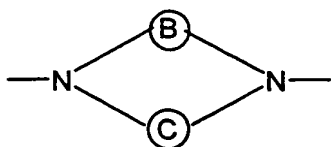
- 5 12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que le cryptate de terre rare est constitué d'au moins un sel d terre rare complexé par un composé macropolycyclique répondant à l'une des formules II ou III ci-après :



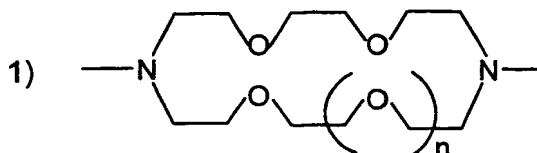
10

dans lesquels :

- le cycle de formule



est l'un des cycles suivants :

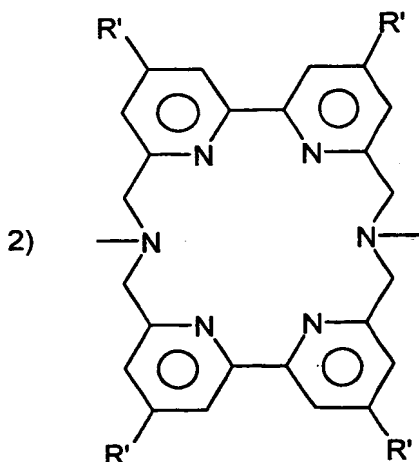


$n = 0$ ou 1

macrocycle $[N_2O_4]$ ou cycle (22)

macrocycle $[N_2O_3]$ ou cycle (21)

5



macrocycle bis-pyridine

- Y est un groupe ou un bras d'espacement qui est constitué par un radical

- 10 organique bivalent, choisi parmi les groupes alkylène linéaires ou ramifiés en C_1 à C_{20} contenant éventuellement une ou plusieurs doubles liaisons et/ou éventuellement contenant par un ou plusieurs hétéroatomes tels que l'oxygène, l'azote, le soufre, le phosphore ou un ou plusieurs groupe(s) carbamoyle ou carboxamido ; parmi les groupes cycloalkylène en C_5 à C_8 ou parmi les groupes
- 15 arylène en C_6 à C_{14} , lesdits groupes alkylène, cycloalkylène ou arylène étant éventuellement substitués par des groupes alkyle, aryle ou sulfonate ;

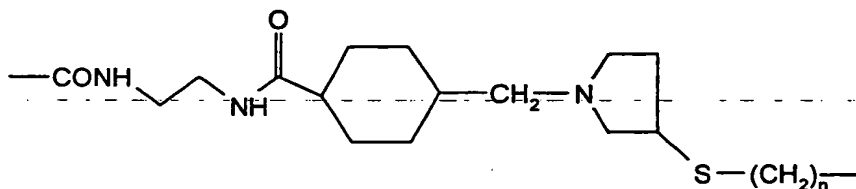
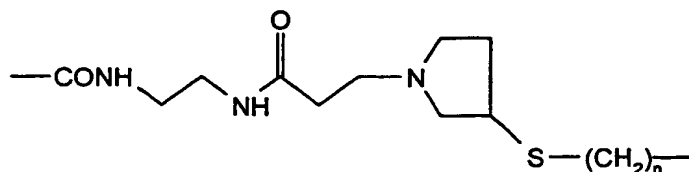
- Z est un groupe fonctionnel susceptible de se lier de façon covalente avec une substance biologique ;

- R est un groupe méthyle ou représente le group -Y-Z ;

- R' est l'hydrogène ou un groupe -COOR'' dans lequel R'' est un group alkyle en C₁ à C₁₀ et représente de préférence le groupe méthyle, éthyle ou tertibutyle ou bien R' est un groupe -CO-NH-Y-Z.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que le cryptate de terre rare est lié à l'oligonucléotide par l'intermédiaire d'un bras d'espacement constitué par un radical organique bivalent, choisi parmi les groupes alkylène linéaires ou ramifiés en C₁-C₂₀, contenant éventuellement une ou plusieurs doubles liaisons ou triples liaisons et/ou contenant éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes, tels que l'oxygène, l'azote, le soufre, le phosphore ou un ou plusieurs groupe(s) carbamoyle ou carboxamido ; les groupes cycloalkylène en C₅-C₈ et les groupes arylène en C₆-C₁₄, lesdits groupes alkylène, cycloalkylène ou arylène étant éventuellement substitués par des groupes alkyle, aryle ou sulfonate.

14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que le bras d'espacement est choisi parmi les groupes :



dans lesquelles n = 2 à 6, et -CONH-(CH₂)₆-, la liaison via le groupe -CONH ayant lieu au niveau du cryptate.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que le cryptate de terre rare est un cryptate d'euprimum.

16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que le cryptate de terre rare est le cryptate d'euprimum Eu trisbipyridine ou Eu [bis-diéthoxybipyridine.bipyridine] .

17. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, caractérisé en ce que le conjugué fluorescent est lié de manière covalente à l'un

des membres d'un couple de molécules capables de se lier sp'cifiquement entre elles, en particulier un récepteur cellulaire, un antigène, un anticorps ou un acide nucléique.

- 5 18. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, caractérisé en ce qu'en plus dudit conjugué fluorescent, on met en œuvre dans le dosage un marqueur fluorescent comprenant un composé fluorescent accepteur.

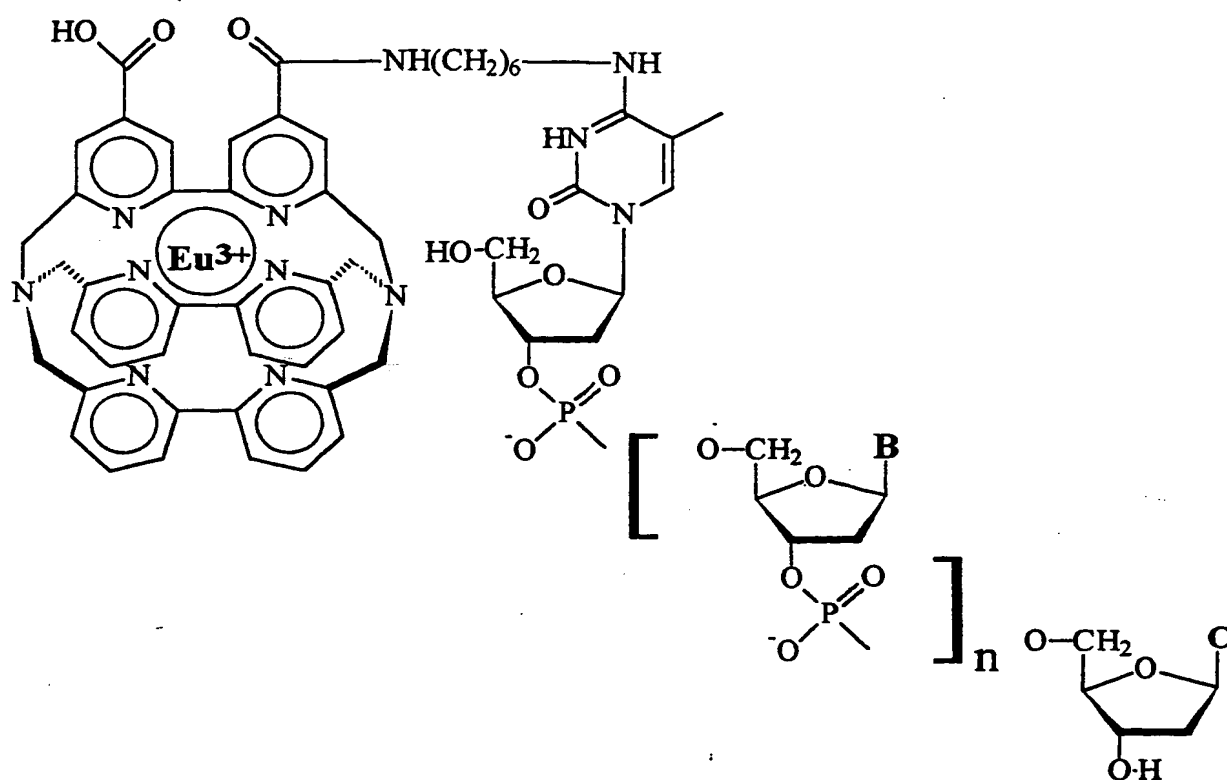
19. Conjugué fluorescent comprenant un oligonucléotide lié à un cryptate de terre rare, tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 16.

des membres d'un couple de molécules capables de se lier spécifiquement entre elles, en particulier un récepteur cellulaire, un antigène, un anticorps ou un acide nucléique.

18. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, caractérisé en ce qu'en plus dudit conjugué fluorescent, on met en œuvre dans le dosage un marqueur fluorescent comprenant un composé fluorescent accepteur.

19. Conjugué fluorescent, caractérisé en ce qu'il comprend un oligonucléotide lié à un cryptate de terre rare.

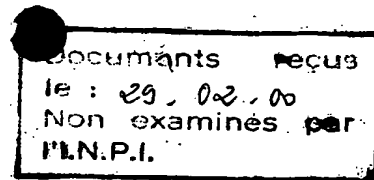
Figure 1



Conjugué KH-ODN1

B = Adénine (A), Guanine (G), Cytosine (C), Thymine (T)

C = Cytosine



des membres d'un couple de molécules capables de se lier spécifiquement entre elles, en particulier un récepteur cellulaire, un antigène, un anticorps ou un acide nucléique.

18. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, caractérisé en ce qu'en plus dudit conjugué fluorescent, on met en œuvre dans le dosage un marqueur fluorescent comprenant un composé fluorescent accepteur.
- 5



10/10/10
10/10/10